ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DEL SUELO DE VIÑEDOS MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE MASAS

Lucía Peralta, Inés Pacheco, Almudena Escobar-Niño, Francisco Javier Fernández-Acero
Laboratorio de Microbiología y Proteómica, Instituto de Investigación Vitivinícolas y Agroalimentarias (IVAGRO).
Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Universidad de Cádiz; Puerto Real, España.

1. Resumen

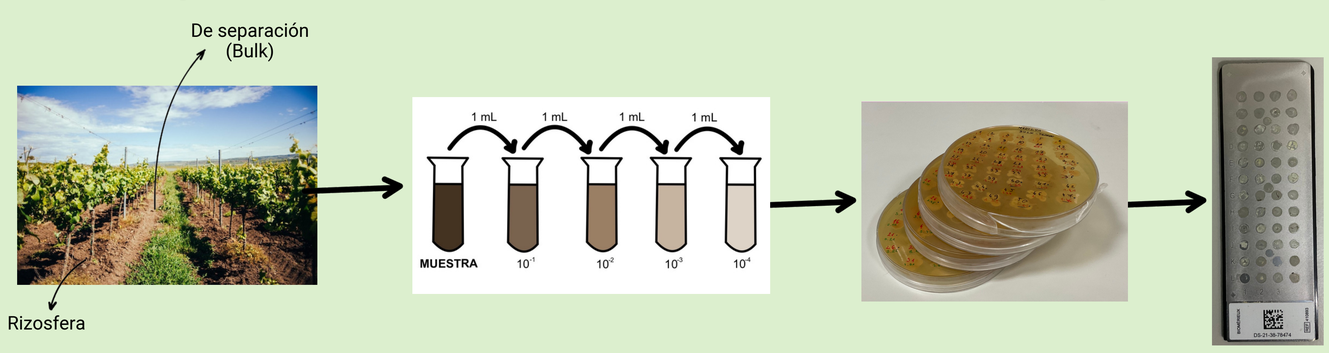
Dentro de las disciplinas "-ómicas", la proteómica engloba un conjunto de técnicas que se encargan del estudio de los proteomas, con el fin de estudiar el ciclo de vida, la dinámica y las interacciones entre diferentes organismos. El proteoma se define como el conjunto de proteínas expresadas por un organismo, célula o tejido. Gracias a los nuevos avances biotecnológicos, la proteómica se ha convertido en una técnica fundamental en el diagnóstico microbiológico, ya que, entre otras cosas, permite caracterizar individuos y poblaciones microbianas de una manera rápida mediante el estudio de su perfil proteico. Esta ciencia no sólo puede ser aplicada en la medicina, sino que debido a la gran cantidad de ventajas que posee la podemos utilizar en otros sectores, como el agroalimentario, permitiendo el diagnóstico de microorganismos de interés o su variación en función de las condiciones externas.

En el presente trabajo, se pretende demostrar la aplicabilidad de la proteómica basada en espectrometría de masas tipo MALDI-TOF en el estudio de las poblaciones bacterianas, existentes en dos tipos de suelo, raíz y de separación de leños en viñedos. Los microorganismos aislados fueron analizados mediante MALDI-TOF en un equipo VITEK®MS Plus, por comparación de los espectros obtenidos con la base de datos de diagnóstico (IVD) y de investigación (RUO).

Estos análisis han permitido determinar la viabilidad del sistema ensayado para el estudio de la microbiota del suelo. Se ha revelado la presencia de poblaciones microbianas que, con vistas a un futuro próximo, podrían reducir el uso de fertilizantes químicos mediante el aprovechamiento de las actividades de las bacterias presentes en la zona.

2. Materiales y métodos

2.1 <u>Toma de muestras</u>: Se analizó suelo proveniente de 2 muestras de rizosfera y 4 muestras de la zona de separación (bulk), tanto muestras congeladas como muestras frescas. Como biomasa inicial se tomó 1 gramo de cada una de las muestras.



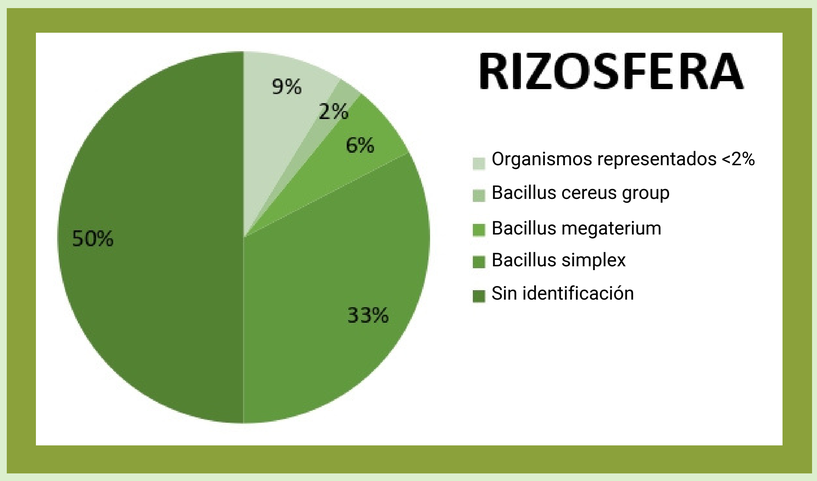
2.2 <u>Tratamiento y preparación</u>: Las muestras fueron diluidas en 9 mL de agua estéril y sometidas a dilución seriada. 100 µL de la dilución 10^{2} fueron cultivados en placas de TSA. 50 colonias al azar de cada una de las muestras fueron aisladas. Finalmente, mediante un "lápiz" con puntas de teflón se colocó cada una de las colonias en los pocillos de un portaobjeto especial ("slide"), y sobre ellos se añade 1 µL de matriz para su posterior ionicazión por MALDI.

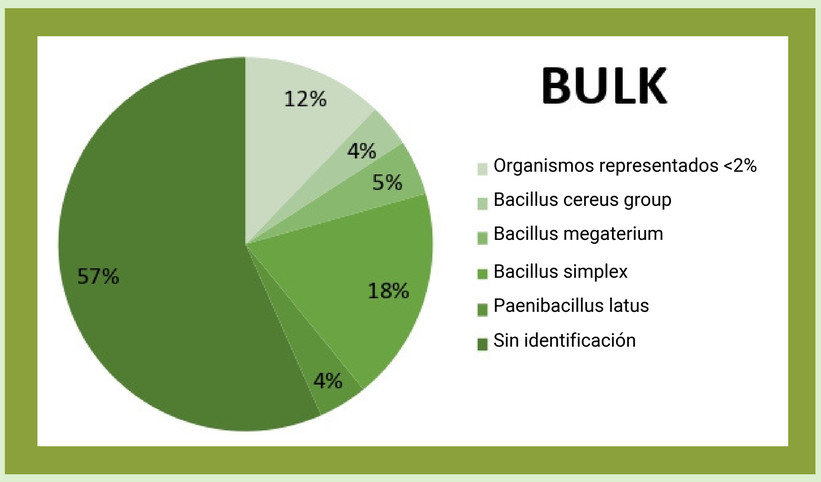
Es importante tener en cuenta que, para que se realice una correcta identificación bacteriana, se requiere de un microorganismo control (*E.coli*); el cual debe estar cultivado 24 hrs antes de su uso a 35ºC en placas de agar-sangre. La información de cada una de las muestras fue introducida en el software de preparación VITEK®MS, y se escanea el QR de cada "slide", lo que asegura la trazabilidad de las muestras.

3º Identificación mediante MALDI-TOF: la muestra es ionizada mediante un láser, liberando una "nube" de proteínas que son aceleradas mediante un campo eléctrico y ascienden por un tubo sometido a vacío hasta el detector de tiempo de vuelo, allí se genera un espectro que representa la composición proteica de la muestra. Los resultados serán enviados a la estación de adquisición VITEK®MS.

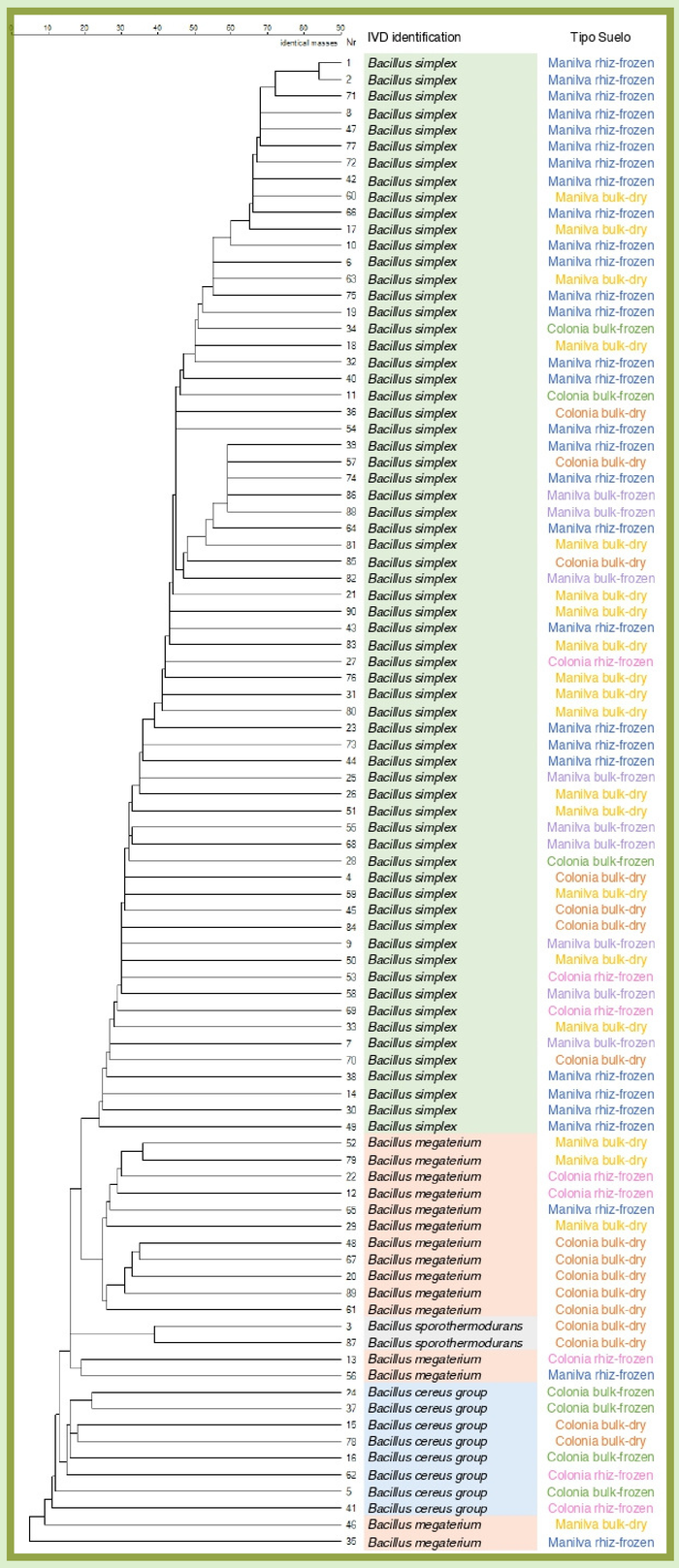
3. Resultados y Discusión

Finalmente se aislaron y llevaron a estudio un total de 281 colonias, las cuales fueron tratadas como colonias bacterianas. Tras realizar las pertinentes identificaciones y comparara los resultados con la base de datos cerrada (IVD) y la base de datos abierta (RUO) se obtuvieron los siguientes porcentajes de identificación:





También se vio ver que las muestras frescas de la zona de separación ("Bulk") tuvieron un porcentaje de identificación mayor (48%) que las muestras congeladas (38%); mediante estas identificaciones se observó que el género *Bacillus* es el más abundante en las muestras de suelo. Con el fin de establecer la existencia de una relación entre las cepas de *Bacillus* aisladas y determinar la existencia de cepas adscritas a alguna parcela o muestra se realizó una aproximación taxonómica mediante el perfil de proteínas determinado por MALDI-TOF mediante RUO. Estas relaciones parecen determinar similitudes entre las cepas y diferencias respecto al origen, la relevancia de estas relaciones y su papel con la microbiota del suelo se estudiara en ensayos futuros.



4. Referencias

[1] VITEK® MS Reagents/Accessories. bioMérieux. https://www.biomerieux-usa.com/vitek-ms-reagents-accessories.

[2] VITEK® MS | bioMérieux España. bioMérieux España. https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/vitekr-ms

[3] Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica.